

THESIS

München

1968

Nachweis der Serumcholinesterase
durch Auftrennung von Serum mit der
Hochspannungselektrophorese
(VAP-ELPHOR)

LANE MEDICAL LIBRARY
STANFORD UNIVERSITY
MEDICAL CENTER
STANFORD, CALIF. 94305

WILTRUD SCHUSTER



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153307_0177

Aus der Anaesthesieabteilung der Chirurgischen
Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. F. Holle

Leiter der Anaesthesieabteilung:

P.D. Dr. med. A. Doenicke

Nachweis der Serumcholinesterase durch Auftrennung
von Serum mit der Hochspannungselektrophorese (VAP-
ELPHOR)

In vitro Untersuchungen der Enzymhemmung durch
Epontol

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin verfaßt und einer Hohen Medizinischen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu
München vorgelegt

von

Wiltrud Schuster

aus Heidenheim

1968

Aus der Anaesthesieabteilung der Chirurgischen
Poliklinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. F. Holle

Leiter der Anaesthesieabteilung:

P.D. Dr. med. A. Doenicke

Nachweis der Serumcholinesterase durch Auftrennung
von Serum mit der Hochspannungselektrophorese (VAP-
ELPHOR)

In vitro Untersuchungen der Enzymhemmung durch
Epontol

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten
Medizin verfaßt und einer Hohen Medizinischen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu
München vorgelegt

von

Wiltrud Schuster

aus Heidenheim

1968

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter : P.D. Dr. med. A.Doenicke
Mitberichterstatter : Prof. Dr. med. F.Holle
Dekan : Prof. Dr. med. F.Marguth

Tag der mündlichen Prüfung : 9.10.1968

G L I E D E R U N G

Nachweis der Serumcholinesterase in Eiweißfraktionen
nach Auftrennung durch Hochspannungs-Elektrophorese

In vitro Untersuchungen der Enzymhemmung durch Epontol

A) Einleitung

1. Definition der Cholinesterasen
2. Elektrophoretische Trennmethoden
 - a) Papier-Elektrophorese
 - b) Stärkegel-Elektrophorese
 - c) Zweidimensionale Elektrophorese
 - d) kontinuierliche trägerfreie Elektrophorese (VAP-ELPHOR)

B) Methodik

1. Trennbedingungen der Serumelektrophorese
2. Photometrische Bestimmung der Eiweißkörper
3. Bestimmung der Serumcholinesterase nach Kalow
4. Colorimetrische Bestimmung der Serumcholinesterase nach Metcalf-Hestrin
5. Enzymhemmung durch Epontol
 - a) Dialyse von Serumfraktionen
 - b) Herstellung einer Epontol-Verdünnungsreihe
 - c) Bestimmung der Serumcholinesterase nach Kalow bei Zusatz von Epontol

C) Ergebnisse

1. Gruppe I: 3 neunstündige Elektrophoresen
2. Gruppe II: 14 zehnstündige Elektrophoresen
3. Gruppe III: 2 Elektrophoresen von 22 bzw.
26 Std Versuchsdauer
4. p_H -Messung der 48 Trennfraktionen

C)

5. Vergleichende Elektrophoresen eines Plasmozytom- und eines Normalserums
6. Hemmung der Serumcholinesterase in dialysierten Elektrophoresefraktionen durch Epontol in verschiedener Konzentration

D) Diskussion der Versuchsergebnisse

1. Besonderheit des trägerfreien, elektrophoretischen Trennverfahrens
2. Die charakteristische elektrophoretische Beweglichkeit der Serumcholinesterase - Literaturvergleich
3. Enzymhemmung durch Epontol in vitro und im Organismus - Literaturvergleich

E) Zusammenfassung

Nachweis der Serumcholinesterase in Eiweißfraktionen nach Auftrennung durch Hochspannungselektrophorese

In vitro Untersuchungen der Enzymhemmung mit Epontol

Als Cholinesterasen (CHE) werden verschiedene, mehr oder minder nahe Verwandte Carboxylesterhydrolasen bezeichnet, die zum einen Cholinester mit höherer Geschwindigkeit spalten als andere Ester und die zum anderen durch Eserin spezifisch gehemmt werden. Neben den aliphatischen und aromatischen Estern des Cholins spalten sie zahlreiche Substrate anderer Esterasen, wie der Aryl- und Aliesterasen. Man ist übereingekommen, als Cholinesterasen nur solche Enzyme zu benennen, die durch eine Eserinkonzentration von 10^{-5} M sehr stark oder völlig gehemmt werden.¹⁵ Eine eindeutige Definition ist deshalb sehr schwierig, da zu anderen Hydrolasen fließende Übergänge vorkommen.

1914 versuchte Dale⁷ erstmals, die kurzandauernde Wirkung des Acetylcholins mit der Existenz eines acetylcholin-spaltenden Enzyms im Blut zu erklären. Seine Überlegungen konnten später untermauert werden. Stedman et. al.²⁷ stellten 1932 aus Pferdeserum ein Enzym dar, das Acetylcholin und andere Cholinester spaltet. Als erste führten sie in die Literatur den Namen "Cholinesterase" ein. Simonart²⁶ (1933) betrachtete dieses Enzym aus dem Serum als ein spezifisches Enzym für Cholinester, jedoch nicht für Acetylcholin, da es Butyrylcholin und Propionylcholin wesentlich schneller spaltet als Acetylcholin. Spätere Experimente erbrachten, daß die Cholinesterasen des Serums

nicht spezifisch sind für Cholinester, wenngleich sie diese schneller spalten als Nichtcholinester (Glick 1938, 1939, 1941)¹¹. Alles und Hawes konnten 1940 beweisen, daß die Cholinesterase des menschlichen Serums sich deutlich von den Esterasen unterscheidet, die in den Erythrozyten vorkommen.¹ Richter und Croft zeigten 1942, daß sich die Cholinesterasen von anderen, "einfachen" Esterasen (Arylesterasen) abgrenzen lassen durch ihre Hemmbarkeit bei niedrigen Konzentrationen von Eserin.²³

Im Blut des Menschen unterscheidet man seit den Untersuchungen von Alles und Hawes (1940)¹ über die Cholinesterasen im Blut des Menschen zwei Haupttypen, die in der Folgezeit verschiedene Bezeichnungen erhielten:

- a) echte Cholinesterase,¹⁸ spezifische Cholinesterase,⁴ Acetylcholinesterase,⁶ E.C.3.1.1.7
systematischer Name: Acetylcholin-acetylhydrolase
- b) Pseudocholinesterase,¹⁸ unspezifische Cholinesterase,²⁰ Cholinesterase,⁶ E.C.3.1.1.8
systematischer Name: Acetylcholin-acylhydrolase

(Commission on Enzymes of the International Union of Biochemistry)

Die Acetylcholinesterase spaltet Acetylcholin schneller als Cholinester mit längeren Acylketten. Butyrylcholin wird durch sie nicht oder nur sehr langsam hydrolysiert.¹⁵ Sie zeigt bei höherer Acetylcholinkonzentration eine Abnahme der Spaltungsgeschwindigkeit (Optimum zwischen 10^{-3} und 10^{-2} M). Ihre physiologische Funktion wird in der Spaltung des Acetylcholins gesehen, dessen Wirkung durch Hydrolyse aufgehoben wird.²

Sie kommt vornehmlich im Zentralnervensystem, in der Skelettmuskulatur, in den Erythrozyten, in elektrischen Organen von Fischen und im Gift bestimmter Schlangen vor.⁴⁵

Die Pseudocholinesterasen spalten Butyrylcholin schneller als Acetylcholin; sie zeigen bei steigender Acetylcholinkonzentration keine Abnahme der Spaltungsgeschwindigkeit und kommen vornehmlich in der Leber, im Darm, im Plasma der meisten Vertebraten und zusammen mit der Acetylcholinesterase auch im Zentralnervensystem und in anderen Geweben vor.

Zur Differenzierung der Cholinesterasetypen wurden verschiedene Methoden erprobt:

1. Aktivitäts- p_S -Kurven mit Acetylcholin als Substrat⁴⁵

Die Acetylcholinesterase zeigt bei höherer Acetylcholinkonzentration eine Abnahme der Spaltungsgeschwindigkeit, die Pseudocholinesterase dagegen nicht. Im ersten Fall ist die Aktivitäts- p_S -Kurve annähernd glockenförmig, im zweiten Fall s-förmig.

2. Verwendung spezifischer Substrate⁴⁸

a) Acetyl- β -Methylcholin (nur das D-Isomere) ist ein mehr oder weniger spezifisches Substrat für die Acetylcholinesterase. Es wird von der Pseudocholinesterase nicht gespalten.^{4,19}

b) Die Pseudocholinesterasen hydrolysieren Benzoylcholin und Butyrylcholin, die Acetylcholinesterase nicht oder nur mit sehr geringer Geschwindigkeit. Benzoylcholin wird durch die in ungereinigten Enzympräparaten häufig vorkommenden Aliesterasen nicht hydrolysiert.⁴⁵

3. Charakterisierung der Cholinesterasen durch spezifische Hemmstoffe.

- - -

Darstellung der Serumcholinesterase durch elektrophoretische Trennmethode.

Um die Serumcholinesterase präparativ und analytisch darzustellen, bedient man sich der Elektrophorese, einer Trennmethode, die auf der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit geladener Teilchen, wie der Eiweißkörper, in einem elektrischen Feld beruht. Die Eiweißkörper liegen, wie man heute weiß, nicht als kolloidale Partikel in ihren Lösungen vor, sondern als Makromoleküle von definierter Größe und Gestalt, deren elektrische Ladung auf die anionischen und kationischen Gruppen der sie aufbauenden Aminosäuren zurückzuführen ist.⁴ Die elektrophoretische Trennung läßt sich auf sehr empfindliche Medien, wie die Enzym-Protein-Komplexe im Serum anwenden, da es sich dabei nur um die Einwirkung elektrostatischer Kräfte auf die geladenen Teilchen handelt.

Hier seien kurz Möglichkeiten der elektrophoretischen Serumauftrennung genannt.

a) Die Papierelektrophorese

Auf einem mit Pufferlösung getränkten Filterpapierstreifen wird das zu trennende Substanzgemisch in Form einer schmalen Zone aufgetragen; an die Schmalseiten des porösen Streifens legt man ein elektrisches Feld an. Die einzelnen Komponenten des Substanzgemischs wandern entsprechend ihrer Ladung und der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit unterschiedlich weit. Nach beendetem Trennvorgang können sie durch spezifische Farbreaktion oder durch direkte Photometrie dargestellt werden.

b) Die Stärkegelelektrophorese⁴

Bei der Papierelektrophorese bietet das Papier der Bewegung der Teilchen praktisch kaum einen Widerstand. Das Stärkegel stellt in geeigneter

Konzentration eine Art Molekülsieb dar, das kleine Teilchen ungehindert passieren läßt, die Bewegung größerer aber teilweise erheblich einschränkt. Durch diesen zusätzlichen Einfluß wird das Auflösungsvermögen in der Weise erhöht, daß Teilchen, die auf Grund ihrer Ladung auf Papier gleichschnell wandern, aber unterschiedliche Größe besitzen, noch getrennt werden können. Auch das Schwerfeld kann bei der Elektrophorese für Versuche ausgenützt werden, indem man eine vertikale Versuchsanordnung wählt und durch geeignetes Anlegen des elektrischen Feldes die Teilchen in Richtung bzw. entgegen der Schwerkraft wandern läßt.

c) Zweidimensionale Elektrophorese¹¹

Bei der Beurteilung eines eindimensionalen Elektropherogramms läßt sich oft nicht entscheiden, ob eine Bande homogen ist, oder sich aus mehreren Komponenten zusammensetzt. Zur Klärung dieses Problems wird nach einer bestimmten Laufzeit in der ersten Dimension die Elektrophorese gestoppt und in einer zur ersten Dimension senkrechten Richtung bei gleichen Bedingungen fortgesetzt.

Besteht eine Bande aus Komponenten gleicher Beweglichkeit, so kann man die Differenzierung durch Änderung der Versuchsbedingungen (Puffer, Feld) in der zweiten Dimension erreichen.

Die genannten diskontinuierlichen Trennverfahren erfordern verhältnismäßig großen Zeitaufwand für das Ansetzen des Versuchs und die Elution der Fraktionen nach jeder Trennung; sie sind für präparatives Arbeiten, bei dem es wichtig ist, größere Mengen der Fraktionen zu gewinnen und weiterzuverwerten, nur wenig geeignet.

d) Die kontinuierliche Ablenkungselektrophorese⁴⁾

Die trägerfreie kontinuierliche oder Ablenkungselektrophorese ist ein neuer, leistungsfähigerer Weg der präparativen Serumauftrennung, beschrieben erstmals von Graßmanq und Hannig 1964. Sie entwickelten ein Hochspannungselektrophoresegerät (VAP-ELPHOR), das es ermöglichte, Serum in vollkommen trägerfreiem, homogenem Milieu in Albumin- und Globulinfraktionen aufzutrennen.

Eine Elektrolytlösung strömt quer zu den Kraftlinien eines elektrischen Feldes. Das zu trennende Serum wird kontinuierlich an einer eng begrenzten Stelle dem strömenden Medium zugeführt, so daß Eiweißkörper mit unterschiedlicher elektrophoretischer Beweglichkeit durch das Feld unterschiedliche Ablenkung erfahren und bei Verlassen der Trennkammer an verschiedenen Stellen entnommen werden können. Da sowohl die Strömungsgeschwindigkeit wie die Feldstärke in weiten Grenzen experimentell variierbar sind, kann grundsätzlich jeder gewünschte Ablenkungswinkel eingestellt werden. Seine Größe ($\tan \alpha$) ergibt sich aus dem Verhältnis der elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit zur Strömungsgeschwindigkeit des Puffers.

Zur Aufrechterhaltung eines stationären, völlig konstanten Betriebes ist eine vollkommen lamina-re und gleichförmige Pufferströmung, sowie ein homogenes elektrisches Feld Voraussetzung. Dies gelingt bei folgender Anordnung:

Zwischen zwei in einem Abstand von 0,5 mm parallel angeordneten Spiegelglasplatten strömt die Pufferlösung als gleichmäßiger Film. Seitlich angebrachte Elektrodenräume mit Platinelektroden, die ständig mit Pufferlösung umspült werden, geben über Membranstreifen den elektrischen Kontakt mit dem Pufferfilm. Die Zuführung der Pufferlösung in die

Trennkammer erfolgt zwangsweise und vollkommen gleichförmig durch sechs entsprechend verteilte Zutrittsöffnungen entlang des Randes der oberen Glasplatte mittels einer Sechskanal-Schlauchpumpe. Die Menge der Pufferzuführung und damit die Strömungsgeschwindigkeit innerhalb der Trennkammer ist kontinuierlich und in beliebigen Grenzen variierbar. Die Entnahme der Fraktionen und des Puffers am gegenüberliegenden Rand der Kammer geschieht ebenfalls zwangsweise und völlig gleichmäßig durch eine Entnahmevorrichtung, die im Prinzip eine Vielzahl kleiner kommunizierender Gefäße darstellt. Da jedes Gefäß mit dem ihm benachbarten über die Zuführung mit dem Trennraum in Verbindung steht, müssen sich bei waagerechter Lage alle Gläschen vollkommen gleichmäßig füllen. Dadurch bleibt zwangsläufig auch die Strömung in der Kammer gleichförmig.

Um einen kontinuierlichen Betrieb aufrecht zu erhalten, müssen die kleinen Auffanggefäße rasch und gleichmäßig entleert werden. Dies geschieht durch eine Absaugvorrichtung aus 48 Kapillarröhrchen, die in eine geschlossene Kammer mit Reagenzgläsern mündet. Wenn die Auffanggefäße in der Entnahmevorrichtung gefüllt sind, wird, gesteuert durch eine Zeitschaltuhr, kurzzeitig die Reagenzglaskammer evakuiert. Die kleinen Entnahmegefäße werden auf diese Weise schnell entleert. Schließlich wird in den Absaugröhrchen Luft nachgesogen und dadurch die Heberwirkung der dünnen Kapillaren aufgehoben. Dieser Vorgang wiederholt sich beliebig oft in zeitlich genau vorzuwählenden Intervallen.

Die Kühlung der Glasplatten erfolgt durch Bestreuen mit gekühlter Luft von -10 bis -35°C . Dadurch wird das Durchbiegen der Platten weitgehend vermieden und ein homogenes elektrisches Feld aufrecht erhalten. Zwei Kühlmäntel aus Kunst-

stoff sind auf die beiden Glasplatten gepreßt, so-
daß über Luftzuführstutzen durch ein Verteilungs-
rohr mit Bohrungen die Kühlluft gleichmäßig auf
die Platten verteilt wird. Zur Isolierung ist ein
weiterer Mantel über dem eigentlichen Kühlmantel
angebracht.

Das zu trennende Substanzgemisch wird durch eine
der vorgesehenen Öffnungen der Trennkammer mittels
einer Dosiervorrichtung zugeführt, die einen gleich-
mäßigen und in bestimmten Grenzen variierbaren Sub-
stanzzusatz ermöglicht. Zur Vermeidung des uner-
wünschten Ein- und Ausströmens von Pufferlösung in
die Trennregion aus den durchströmten Elektroden-
räumen und umgekehrt über die Ionenaustauschermem-
branen, müssen die Druckverhältnisse in den Elek-
trodenräumen denen im Trennraum angepaßt sein.
Dies wird erreicht durch entsprechend angebrachte
Niveaugefäße an der Zu- und Abführung der Elektro-
denspülflüssigkeit.

M e t h o d i k

Trennung von Serumproteinen durch die kontinuierliche, trägerfreie Hochspannungselektrophorese (VAP-ELPHOR)

Trennbedingungen:

Zur Elektrophorese menschlichen Serums verwendet man in der Trennkammer "Tris"-Puffer. "Tris" ist 9,7 g Trihydroxymethylaminomethan, gelöst zu einem Liter. Die Einstellung des p_H -Wertes 8,6 erfolgt mit 45 ml zweimolarer Zitronensäure.

Der Elektrodenraum wird mit dem dreifach konzentrierten Kammerpuffer beschickt (29,1 g "Tris" gelöst zu einem Liter; Einstellung des $p_H = 8,6$ durch zweimolare Zitronensäure). Nach Hañig verhindert die höhere Konzentrierung des Elektrodenpuffers eine Veränderung der Elektrolytzusammensetzung während des Versuchs durch Elektrolyseprodukte von den Elektroden her. Die höhere Ionenstärke gewährleiste konstante Elektrolytkonzentration und konstanten p_H -Wert des zur Spülung dienenden Puffers in den Elektrodenleisten auch über längere Versuchszeiten hin.

Als günstiger Pufferdurchsatz der Kammer ergaben sich 135 ml pro Stunde; dies entspricht einer Durchströmungszeit von der Substanzzuführungsöffnung bis zum Eintritt in die Abnahmeleiste von 51 min. Vorzuwählen ist der Pufferdurchsatz durch Einstellen der erforderlichen Umdrehungsgeschwindigkeit an der Getriebewelle der Sechskanal-Schlauchpumpe. Für den oben angegebenen Pufferdurchfluß wurde das kleine Kettenrad auf 9 Umdrehungen pro Minute eingestellt.

Als Ionenaustauschmembranen an den seitlichen Kammer-Elektrodenraum-Grenzen wurden verwendet:

An der Anode: Nepton CR 61, als Kationenaustauscher,
an der Kathode: Nepton AR 111, als Anionenaustauscher.

Die Ablufttemperatur stellt man ein zwischen 4 und 5 ° C; sie wird über einen Regelkreis während des Trennvorgangs konstant gehalten.

Für die Trennung des Serums erwies es sich als günstig, die Stromstärke mit 180 mA vorzuwählen; zwischen den Platinelektroden trat dabei eine Spannung von ca 2200 Volt auf.

Um möglichst günstige Trennbedingungen zu schaffen, stellt man die Proteinkonzentration auf 2 - 3 % ein. Hierzu wird menschliches Serum mit "Tris"-Puffer auf das dreifache verdünnt. Als günstigste Förderleistung der Dosierpumpe erwies sich 1 ml pro Stunde.

Photometrische Bestimmung der Serumeiweißkörper in den Trennfraktionen¹²

Die Serumeiweißkörper werden bestimmt durch ihre Absorption im ultravioletten Licht bei 280 mμ Wellenlänge in Quarzküvetten bei 1 cm Lichtweg. Die Proteinkonzentrationen werden angegeben durch ihre Extinktion multipliziert mit dem Faktor 1000 ($\Delta E \times 1000$). Um in einem sehr empfindlichen Bereich des Spektrophotometers zu arbeiten, wurden die Serumfraktionen 1 : 1 mit Kammertris-puffer verdünnt.

Bestimmung der Serumcholinesterase nach Kalow¹⁶

- I) 0,0667 M Phosphatpuffer, $p_H = 7,4$
- II) Substrat: 2×10^{-4} M Benzoylcholinchlorid
(10^{-4} M Benzoylcholin = 2,437 mg Benzoylcholinchlorid in 100 ml Phosphatpuffer
 $p_H = 7,4$)
- III) Enzym: SCHE, enthalten in Serumfraktionen
 - a) Nullwertansatz:
 - 2 ml I
 - 2 ml III
 - b) Testansatz
 - 1 ml I
 - 1 ml II
 - 2 ml III

Test-Temperatur: 26°C

Test-Dauer: 3 min

Der Test wird in Quarzküvetten (1 cm Lichtweg) bei 240 m μ im Spektrophotometer durchgeführt. Auf konstante Temperatur von 26°C ist zu achten. Die Absorption des Serums wird mit Hilfe eines Nullwertes festgestellt (2 ml Phosphatpuffer + 2 ml Serumfraktion). Der Testansatz enthält 1 ml Phosphatpuffer, 1 ml Benzoylcholinchloridlösung und 2 ml Serumfraktion.

Die Enzymaktivität der SCHE ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz im Testansatz zwischen der 1. und 4. Minute. Sie wird in der Literatur gewöhnlich in Werten angegeben, die sich ergeben durch Multiplikation der Extinktionsdifferenz ΔE mit dem Faktor 1000. (ΔE gemessen bei 26°C über 3 Minuten)

Colorimetrische Bestimmung der Serumcholinesterase nach Metcalf-Hestrin¹⁹ (modifizierter Test)

Die Methode Metcalf-Hestrin beruht auf der Umsetzung des durch die Cholinesterase nicht² gespaltenen Acetylcholinbromids mit alkalischer Hydroxylaminlösung zu Acethydroxamsäure, die als Fe(III)-Komplexion photometriert wird.¹⁰

- I) 2 M Hydroxylaminchloridlösung
 - II) 3,5 M NaOH
 - III) 37 % HCl, 1:2 verdünnt mit aqua dest.
 - IV) 0,37 M Ferrichlorid in 0,1 M HCl
 - V) Substrat : 4×10^{-3} M Acetylcholinbromid
in 0,001 M Na-Acetatlösung
 - VI) Enzym, enthalten in den Serumfraktionen
- Alkalisches Hydroxylamin stellt man her durch Mischen von I und II zu gleichen Volumanteilen unmittelbar vor dem Test.

Zu 1 ml von V pipettiert man 1,5 ml der Serumfraktion. Nach Inkubation von 30 min im Wasserbad bei 37°C kühlt man den Ansatz kurz in Eiswasser ab; dann fügt man der Reihe nach hinzu: 2 ml alkalisches Hydroxylamin, 1 ml III und 1 ml IV.

Herstellung des Kontrollansatzes: Anstelle der Serumfraktion pipettiert man zu dem Substrat (1 ml V) 1,5 ml aqua dest. Inkubationszeit und Temperatur wie beim Testansatz. Zusatz der übrigen Reagentien wie oben angegeben.

Im Colorimeter bestimmt man den Extinktionsunterschied von Kontroll- und Testansatz bei einer Wellenlänge von 546 m μ .

Die Enzymaktivität gibt man an durch Multiplikation des gemessenen Extinktionsunterschiedes ΔE zwischen Kontroll- und Testansatz bei 546 m μ mit dem Faktor 1000.

Methodik zu

in vitro Untersuchungen der Enzymhemmung mit Epontol

Epontol (R) ist die wässrige, 5 %ige Lösung von Propanidid (3-Methoxy-4 (N,N-diäthylcarbamoylmethoxy)-phenylelessigsäure-n-propylester), die als Lösungsvermittler den hydrophoben Teil des Cremophor EL "Tensid" enthält. "Tensid" erhöht die Löslichkeit von Propanidid in Wasser beträchtlich. In klarer Epontollösung liegt Propanidid nicht in molekularer Verteilung vor, sondern in kolloidaler.⁸

Epontol findet in der Klinik Verwendung als Kurz-narkotikum. An Serumfraktionen, die durch kontinuierliche Hochspannungselektrophorese gewonnen wurden, sollte untersucht werden, ob Epontol auf die Serumcholinesterase als Enzyminhibitor wirkt.

- a) Von zwei 22 bzw. 26stündigen Hochspannungselektrophoresen menschlichen Serums wurden jeweils die Fraktionen mit größter Cholinesteraseaktivität der Dialyse gegen Phosphatpuffer von $p_H = 7,4$ unterzogen. Der Dialysiervorgang dauerte 9 Stunden. Jeweils nach 3 Stunden wurde der Phosphatpuffer erneuert. Nach beendeter Dialyse wurde mit Hilfe eines p_H -Meters der p_H -Wert der einzelnen Fraktionen kontrolliert.

- b) Von Epontol wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt mit folgenden molaren Konzentrationen des Epontols:

5×10^{-3}
 5×10^{-4}
 $3,5 \times 10^{-4}$
 $2,5 \times 10^{-4}$
 $1,5 \times 10^{-4}$
 5×10^{-5}
 5×10^{-6}

Zur Verdünnung des Epontols wurde Phosphatpuffer von $p_H = 7,4$ verwendet.

- c) Die jeweiligen Epontolverdünnungen wurden als Inhibitor der Serumcholinesterase bei der Methode Kalow eingesetzt. Sie wurde jetzt wie folgt durchgeführt:

- I) 0,0667 M Phosphatpuffer $p_H = 7,4$
II) Substrat: 2×10^{-4} M Benzoylcholinchlorid
III) Enzym: enthalten in den dialysierten Serumfraktionen, $p_H = 7,4$
IV) Epontollösung in jeweiliger Verdünnung

a) Kontrollwertansatz: 2 ml I
2 ml III

b) Testansatz: 1 ml IV
1 ml II
2 ml III

Der Testansatz enthält 1 ml Benzoylcholinchloridlösung, 2 ml der dialysierten Fraktion und als Inhibitor 1 ml Epontollösung in verschiedener Konzentration.

Zu c)

Der Test wird in Quarzküvetten (1 cm Lichtweg) bei 240 m μ im Spektrophotometer bei konstanter Temperatur von 26 ° C ausgeführt. Ein Nullwertansatz stellt die Absorption des Serums fest. Der Testansatz enthält 1 ml Epontollösung, 1 ml Benzoylcholinchloridlösung und 2 ml der dialysierten Serumfraktion.

Die Enzymaktivität nach Inhibitorzusatz ergibt sich aus der Extinktionsdifferenz ΔE im Testansatz zwischen der 1. und 4. Minute; sie wird angegeben durch $\Delta E \times 1000$.

E r g e b n i s s e

Nach den im Teil Methodik angegebenen Versuchsbedingungen der Hochspannungselektrophorese wurden 28 Serumauftrennungen ausgeführt. Verwendet wurden Mischsera gesunder Personen.

Die Elektrophoresen können in drei Gruppen gegliedert werden:

1. Gruppe I umfaßt drei neunstündige Elektrophoresen. In den drei Serumtrennungen (Tabelle I) findet sich der Gipfel der Albumine in Fraktion 15 - 17. Die Aktivität der Serumcholinesterase wurde parallel mit dem Substrat Benzoylcholinchlorid (Methode Kalow) und mit dem Substrat Acetylcholinbromid (Methode Metcalf - Hestrin) bestimmt.

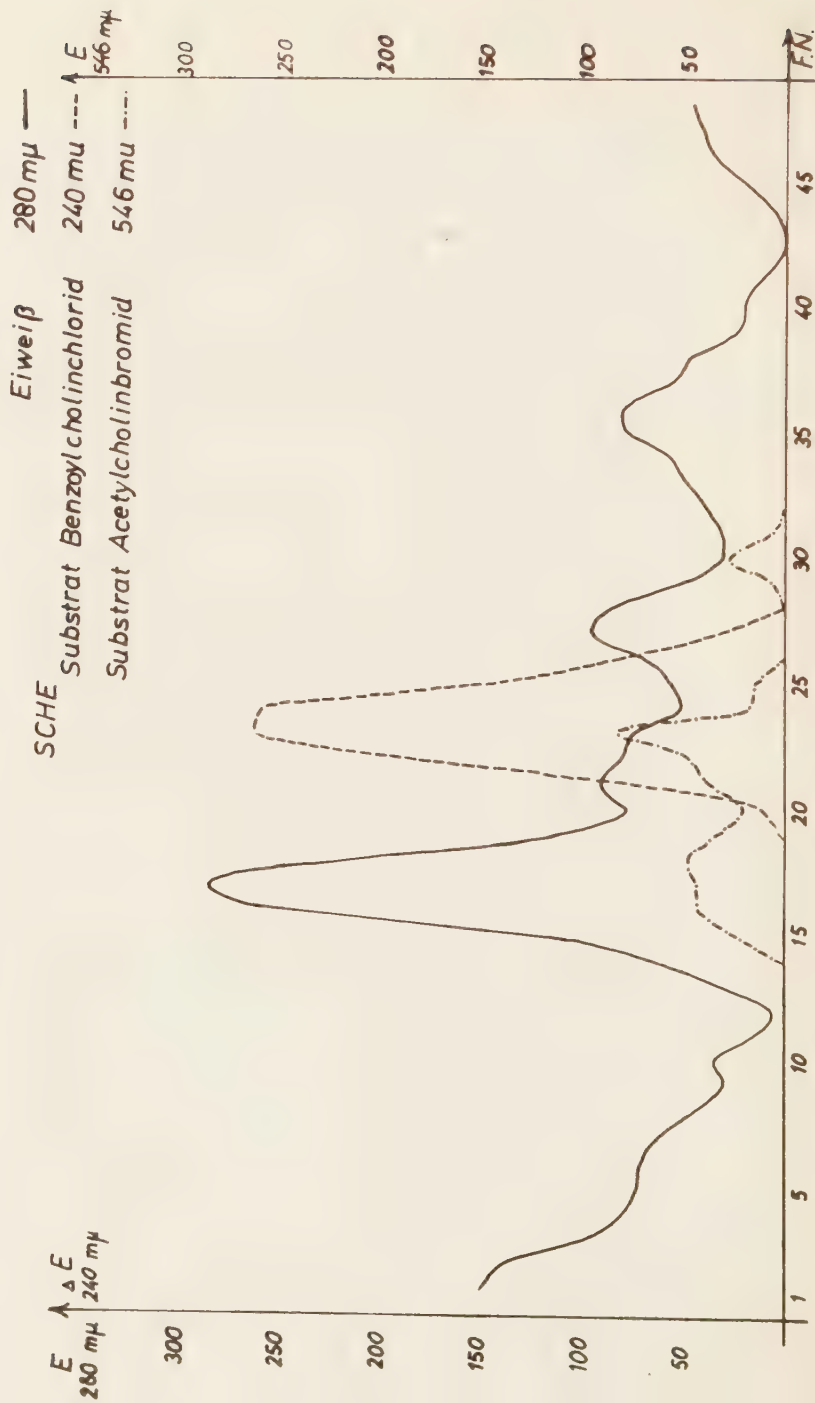
Im Bereich der α_2 - β - Globuline (Fraktion 20 - 25) erscheint bei allen drei Läufen übereinstimmend die größte Aktivität der Serumcholinesterase, bestimmt nach Kalow mit dem Substrat Benzoylcholinchlorid, mit Extinktionen ($\Delta E \times 1000$) von 250 bis 263.

Bei den drei Elektrophoresen erfolgte der colorimetrische Nachweis der Serumcholinesterase mit Acetylcholinbromid als Substrat unter Verwendung von 0,05 ml der Serumfraktionen. Wegen des geringen Enzymangebots in 0,05 ml Fraktion, ergaben sich Enzymaktivitäten von sehr niedrigem Grade zwischen Albumin und - Globulinbereich. Das Verteilungsmuster der Serumcholinesterase zeigte in den drei Elektrophoresen ein sehr verschiedenartiges Bild. Die Extinktionen ($\Delta E \times 1000$) bewegen sich, wenige Werte, die im α_2 - β - Globulinbereich liegen, ausgenommen, zwischen 5 und 40, Werten also, die bei dem hohen Fehlerbereich der angegebenen Hestrin-

Metcalf-Methode kaum Aussagen über Vorkommen und Verteilung der Serumcholinesterase gestatten. Von jeder Fraktion wurden drei Proben angesetzt, die bei der colorimetrischen Messung der Serumcholinesterase-Aktivität untereinander erhebliche Schwankungen der Meßwerte zeigten.

Da das Serum beim Einbringen in die Trennkammer schon 1 : 2 verdünnt wird und während des Trennvorgangs durch den Kammertrispuffer eine weitere Verdünnung erfährt, ist in den Trennfractionen etwa mit einer Serumverdünnung auf das dreihundertfache zu rechnen. Nach den Originalangaben von Hestrin sind mit 1 ml Acetylcholinbromidlösung (0,004 M Acetylcholinbromid in 0,001 M Na-Acetatlösung) 0,05 ml Serum zu inkubieren; dies bedeutet bei Verwendung der aus der Elektrophorese gewonnenen Fraktionen, daß dem Substrat 1,5 ml der jeweiligen Fraktion hinzuzufügen sind. Bei allen folgenden Elektrophoresen wurde zur Bestimmung der Serumcholinesterase nach Hestrin 1,5 ml Fraktion verwendet.

Als Beispiel für die Gruppe I dient der Lauf VI vom 21.3.1966, den Abbildung I zeigt. In der Abszisse sind die 48 Fraktionen (F.N.) aufgetragen, in den Ordinaten die Serumeiweißkörper bei 280 mp, $\Delta E \times 1000$ bei 240 mp (Kalow) und bei 546 mp (Metcalf-Hestrin) für die Serumcholinesteraseaktivität.



GRUPPE I : DREI SERUMHOCHSPANNUNGS-ELEKTROPHORESEN(IV,VI,VII)

VON NEUNSTÜNDIGER VERSUCHSDAUER

F.N.	EiWEISS (280m μ)			SERUMCHOLINESTERASE (Substrat: Benzoyl-Ch. Δ Ex1000; 240m μ)						(Substrat: Acetyl-Ch. Ex1000; 546m μ)		
	IV	VI	VII	IV	VI	VII	IV	VI	VII	IV	VI	VII
1	125	150	155	0	2		0	0	0			
2	155	140	148	0	3		0	0	0			
3	110	98	133	0	2		0	0	0			
4	95	80	120	0	3		0	0	0			
5	95	73	85	0	0		0	0	0			
6	-	71	90	-	2		-	0	0			
7	90	63	85	0	0		0	0	0			
8	95	-	76	0	-		0	-	0			
9	85	29	50	1	0		0	0	0			
10	43	35	20	0	2,5		0	0	0			
11	25	16	15	0	0	0	37	0	0			
12	45	5	20	0	0	0	0	0	5			
13	120	30	45	0	5	0	18	0	0			
14	210	60	105	3	0	0	0	0	0			
15	225	113	210	3	1	0	26	23	0			
16	130	250	285	0	0	0	5	42	0			
17	60	285	255	1	0	4	0	43	30			
18	40	215	175	9	2	3	16	47	10			
19	65	115	113	40	0	12	0	33	20			
20	68	78	95	145	10	22	34	20	30			
21	52	90	90	250	73	115	15	38	40			
22	50	81	85	180	185	225	27	48	93			
23	38	75	73	112	263	260	18	82	77			
24	45	50	65	49	257	245	0	18	75			
25	70	53	68	20	140	122	0	15	-			
26	65	68	85	8	84	50	0	0	58			
27	50	95	105	0	33	32	0	0	35			
28	55	85	80	0	0	30	0	0	13			
29	37	50	60	0	0	4	0	5	2			
30	33	30	43	1	0	0	0	27	0			
31	45	30	43	2	0	0	0	6	0			
32	43	38	44	2	0	0	40	0	0			
33	52	48	50	2	0	0	14	0	0			
34	75	55	63	4	0	0	52	0	5			
35	65	78	75	0	0		23	0	0			
36	63	80	85	0	0		12	0	0			
37	70	55	83	3	0		14	0	0			
38	26	48	70	5	0		14	0	0			
39	15	23	50	0	0		13	0	0			
40	25	20	36	0	0		0	0	0			
41	10	13	23	0	0		5	0	0			
42	14	0	23	0	0		0	0	0			
43	35	0	13	0	4		0		0			
44	30	5	19	0	0		0		0			
45	40	18	32	0	0		0					
46	47	35	45	0			0					
47	47	41	51	0			0					
48	58	45	60	0			0					

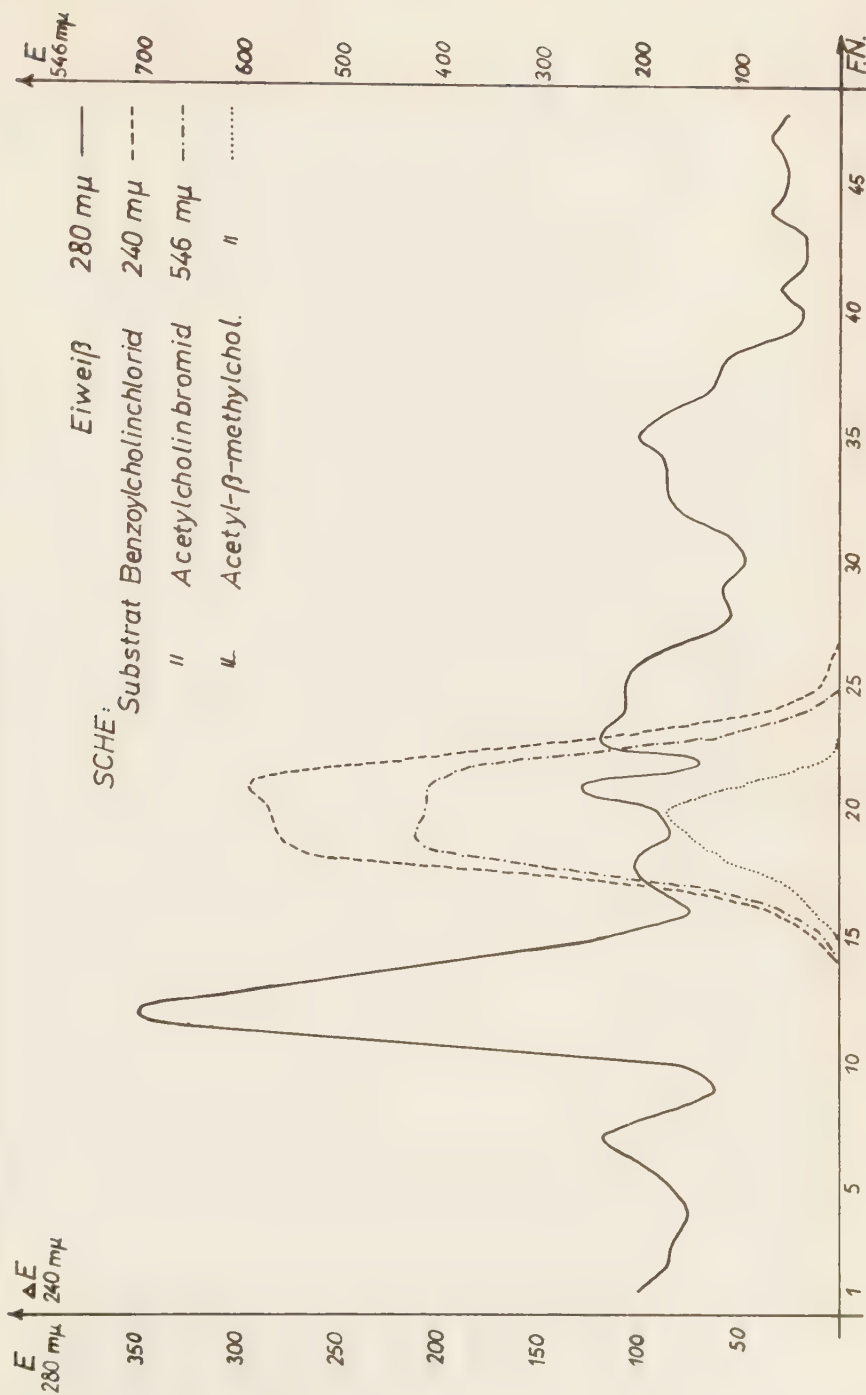
Gruppe II umfaßt 14 Hochspannungselektrophoresen menschlichen Serums von Versuchsdauer 10 Stunden ($\pm$ 1 Stunde), bei drei Versuchen lag sie bei 7 Stunden (V, VIII, XXII). Repräsentativ für diese Gruppe ist der Lauf XVI in Abbildung 2.

Tabelle II zeigt die Verteilung der Serumeiweißkörper aller 14 Läufe im α - β -Globulinbereich, der zur Bestimmung der Cholinesterase ausgetestet wurde.

Die Serumcholinesteraseaktivität, bestimmt mit Benzoylcholinchlorid als Substrat (Methode Kabw) ergab in 10 Läufen einen eingipfeligen Pick maximaler Extinktion im α_2 - β -Globulinbereich. Bei 4 Auftrennungen war die maximale Enzymaktivität zweigipfelig und fand sich ebenfalls bei den α_2 - β -Globulinen. In Tabelle III ist die Serumcholinesteraseaktivität der Läufe aufgeführt.

Zur Bestimmung der Serumcholinesterase mit dem Substrat Acetylcholinbromid (Methode Metcalf - Hestrin) wurden bei allen 14 Serumelektrophoresen 1,5 ml der Fraktionen verwendet. Von jeder Fraktion wurden drei Ansätze hergestellt, deren Meßergebnisse nur geringe Schwankungen aufwiesen. Tabelle IV führt den Mittelwert der gemessenen Extinktionen auf. In allen Auftrennungen erschien übereinstimmend ein eingipfeliges Pick maximaler Serumcholinesteraseaktivität im α_2 - β -Globulinbereich.

Bei drei Auftrennungen (XIV, XV, XVI) wurde als Substrat Acetyl- β -methylcholin (D-Form) bei der Methode Metcalf - Hestrin eingesetzt. Auch hierbei trat im α_2 - β -Globulinbereich Cholinesteraseaktivität auf; in anderen Eiweißbereichen war keine Enzymaktivität zu finden.



GRUPPE II : HOCHSPANNUNGS-ELEKTROPHORESEN VON HUMANSERUM (VERSUCHSDAUER ca 10 STUNDEN)

EIWEISS (E x 1000; 280 $\mu\mu$)

I _P .N.																	
V	13-28	73	175	235	110	53	58	50	43	65	45	25	65	65	55	70	38
VIII	14-29	18	60	120	118	80	45	25	30	30	25	13	18	20	28	36	16
IX	13-28	135	290	355	255	165	95	120	130	123	105	105	125	158	205	165	120
X	12-27	100	220	380	365	240	170	140	135	140	125	115	125	135	180	220	150
XIV	12-27	116	190	278	255	200	160	135	110	113	101	90	90	105	95	123	140
XV	10-25	98	220	310	280	165	96	64	72	88	73	62	58	58	86	92	85
XVI	10-25	88	248	350	278	190	118	75	95	103	85	90	130	70	120	108	108
XVII	14-29	73	210	290	260	163	98	83	85	80	91	70	103	93	93	80	63
XIX	14-29	105	180	245	230	170	115	105	116	111	100	95	120	100	90	105	68
XX	16-31	235	365	460	410	320	300	265	275	253	255	290	230	230	218	175	135
XXI	14-29	83	183	245	136	65	61	76	78	66	53	49	65	79	79	65	48
XXII	13-28	45	73	205	105	63	68	45	60	48	43	40	38	50	65	53	44
XXIII	13-28	69	160	323	320	185	91	93	115	113	100	89	73	98	121	126	115
XXIV	13-28	160	248	345	285	163	104	113	136	131	115	97	90	120	135	148	131

SERUMCHOLINESTERASE IN DEN ELEKTROPHORESEN DER GRUPPE II

(Bestimmung der SCHE nach Kalow mit Benzoylcholin als

Substrat; $\Delta E \times 1000$; 240 mp; 26°C)

L _F .N.	0	5	6	5	6	9	29	69	137	185	44	42	17	2	3	2
V ₁₃₋₂₉	0	5	6	5	6	9	29	69	137	185	44	42	17	2	3	2
VII ₁₅₋₃₁	0	0	4	5	5	20	55	95	120	100	45	30	10	4	0	2
IX ₁₃₋₂₉	0	2	0	4	10	23	85	258	245	223	250	163	75	27	6	0
X ₁₃₋₂₈	0	0	5	8	10	30	123	265	248	240	233	115	80	35	10	0
XIV ₁₄₋₃₀	0	3	3	8	30	100	225	285	260	275	-	140	60	25	7	3
XVIII ₁₆₋₂₈	5	5	7	10	42	160	230	225	230	130	50	15	5			
XV ₁₃₋₂₇	0	0	13	28	85	215	256	270	265	210	85	25	15	0	0	
XVI ₁₃₋₂₇	0	0	12	33	90	230	280	285	295	230	110	40	10	5	0	
XIX ₁₅₋₂₉	2	5	12	12	23	23	40	165	275	275	240	95	65	10	3	0
XX ₁₈₋₂₈		3	0	10	25	105	250	255	250	165	5	0				
XXI ₁₅₋₂₈	0	3	0	6	12	40	150	230	190	85	18	1	0	0		
XXII ₁₅₋₂₇	0	0	5	4	13	40	110	125	75	31	6	3	0			
XXIII ₁₇₋₂₈				8	7	35	126	285	256	258	202	82	20	5	2	
XXIV ₁₇₋₂₈				5	13	50	160	262	247	252	200	65	18	7	0	

SERUMCHOLINESTERASE IN DEN ELEKTROPHORESE-FRAKTIONEN DER GRUPPE II

(Bestimmung der SCHE nach Hestrin mit Acetylcholin als

Substrat ; E x 1000; 546 m μ)

L _F , N.															
V	16-27	0	0	0	20	95	205	195	130	55	5	0	0		
VIII	17-28	5	8	5	30	110	215	165	210	125	50	20	10		
IX	16-27	0	25	55	140	340	440	435	355	205	75	27	6		
X	15-25	0	35	65	158	390	455	440	440	425	365	80	35	10	0
XIV	15-28	0	10	30	85	215	420	420	413	410	-	218	63	20	5
XV	14-27	6	20	50	140	311	423	433	420	330	138	55	18	3	5
XVI	14-27	0	15	68	175	333	425	415	410	320	125	33	0	5	0
XVIII	16-28	23	40	48	140	360	425	430	410	269	123	48	28	15	13
XIX	17-30	0	2	10	30	165	320	345	215	50	23	0	0	10	5
XX	19-32	10	18	45	135	295	375	345	150	45	8	3	0	8	5
XXI	17-28	5	10	30	78	270	370	330	268	48	-	0	0		
XXII	16-27	0	0	0	20	60	155	180	115	40	0				
XXIII	17-27	0	10	40	138	295	360	340	218	70	0	0			
XXIV	17-27	0	10	58	170	310	370	340	205	70	0	0			

Bei sieben Elektrophoresen der Gruppe II wurde nach den Methoden Kalow und Metcalf-Hestrin der Bereich von den Präalbuminen bis zu den γ -Globulinen auf Serumcholinesteraseaktivität untersucht. Gelegentlich traten im γ -Globulinbereich bei der Methode Kalow Extinktionen auf, die aber alle innerhalb des Fehlerbereichs dieser Methode von 2,5 % lagen.

Die Serumcholinesteraseaktivität bei der Methode Metcalf-Hestrin, die vereinzelt im γ -Globulinbereich auftrat, überschritt nie die 4 %-Grenze der maximalen Extinktion und liegt somit im Fehlerbereich der Methode.

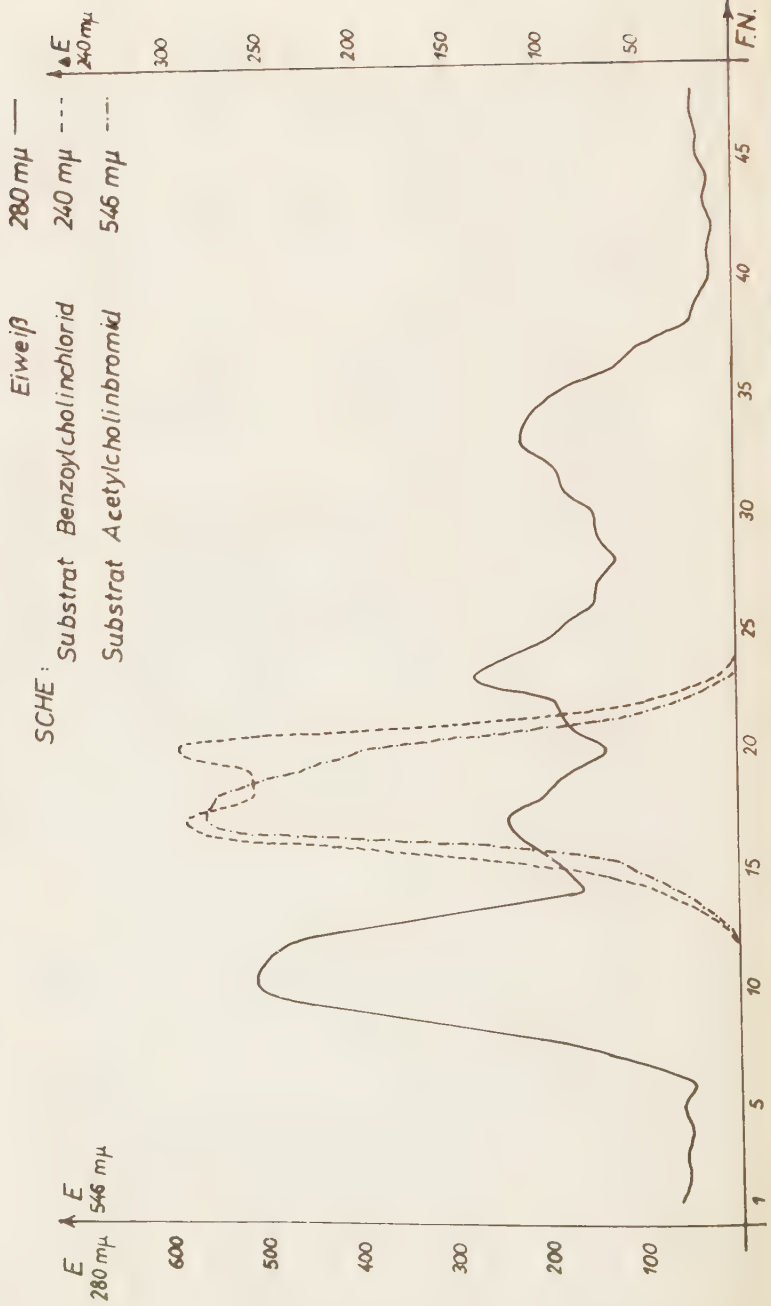
Von Lauf XXIII und XXIV wurden nach Bestimmung der Eiweißkörper und der Serumcholinesterase fünf Fraktionen (20 - 24) der Dialyse gegen Phosphatpuffer von $p_H = 7,4$ unterzogen. In den dialysierten Fraktionen wurden erneut bei 280 m μ die Eiweißkörper photometrisch ermittelt und die Aktivität der Serumcholinesterase mit den Substraten Benzoylcholinchlorid und Acetylcholinbromid. Die Enzymaktivität war nach der Dialyse nur wenig verringert.

Gruppe III besteht aus zwei Elektrophoresen mit einer Versuchsdauer von 22 bzw. 26 Stunden. Stellvertretend für diese Gruppe ist der Lauf vom 24. 11. 1966 in Abbildung 3.

Die Bestimmung der Serumcholinesterase mit Benzoylcholinchlorid als Substrat erbrachte zwei breite Doppelgipfel maximaler Enzymaktivität im α_2 - β - Globulinbereich.

In dem gleichen Bereich findet sich in beiden Läufen der eingipfelige Pick maximaler Enzymaktivität, bestimmt mit dem Substrat Acetylcholinbromid.

GRUPPE III



GRUPPE III : HOCHSPANNUNGS - ELEKTROPHORESEN

VON HUMANSERUM

(Lauf 1 vom 21.11.66; 22-stündig)

(Lauf 2 vom 24.11.66; 26-stündig)

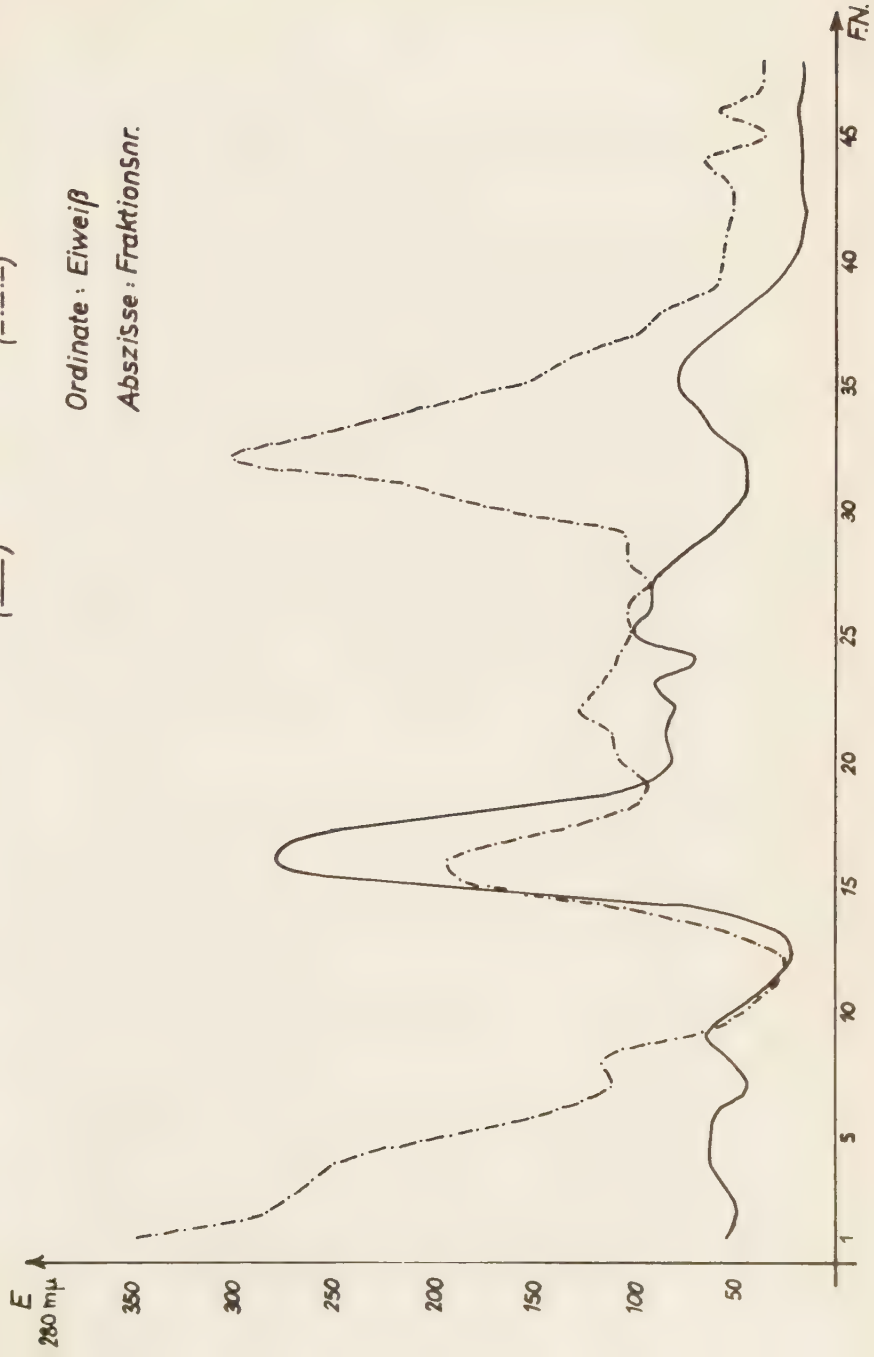
EIWEISS (Ex1000; 280mp)		SERUMCHOLINESTERASE (Substrat: Benzoyl-Ch. (Substr. Acetyl-Ch. ΔEx1000; 240mp) Ex1000; 546mp)			
L 1 12-25	L 2 10-23	L 1 12-25	L 2 11-24	L 1 12-25	L 2 10-23
403	505	5	0	0	0
430	500	5	0	0	0
260	460	12	15	0	0
220	325	28	43	8	23
104	160	50	95	35	60
100	180	123	223	150	113
115	220	240	290	340	270
135	240	225	255	495	560
118	205	225	255	500	550
135	175	240	295	380	485
150	137	185	150	125	390
175	175	80	48	-	190
164	190	30	10	10	60
160	275	5	0	0	0

An einer Elektrophorese wurde eine p_H -Messung aller 48 Fraktionen ausgeführt, um über die Schwankungsbreite des p_H Aufschluß zu erhalten. Die p_H -Messung ergab, in Übereinstimmung mit den Angaben von Hannig über die p_H -Verhältnisse in der Trennkammer, in den anodennahen Fraktionen eine Erniedrigung des p_H - Wertes auf 8, in den kathodennahen Fraktionen nahm der p_H zu bis 9,8. In den Fraktionen 8 - 42 fand sich ein sehr konstanter p_H von 8,6.

In Abbildung 4 wird die Verteilung der Serumeiweißkörper bei einem Plasmozytom-Kranken der einer gesunden Versuchsperson gegenübergestellt unter gleichen Versuchsbedingungen und bei gleich langer Trenndauer. Die Abbildung zeigt, daß der Albumingipfel im Patientenserum deutlich erniedrigt ist. Im Bereich der γ -Globuline erscheint ein sehr hoher Gipfel von Paraproteinen. Zu bemerken ist weiter der große Anschub von Eiweißkörpern, die, ihrem Wanderungswinkel nach zu schließen, von höherer Ladung und niedrigerem Molekulargewicht als die Albumine sein müssen. Sie finden sich in den anodennahen Fraktionen. Fünf Auftrennungen wurden nach der photometrischen Bestimmung der Eiweißkörper nicht weiter ausgewertet, da die Trennqualität ungenügend erschien. Mögliche Ursachen hierfür: gealterte Ionenaustauschermembranen; zu niedrig eingestellte Ablufttemperatur, so daß während des Trennvorgangs ein Eisylinder die Serumaufragsstelle verstopfte; geringfügiger Austritt von Puffer aus der Kammer ließ Kriechströme entstehen und erhebliche Spannungsschwankungen auftreten.

VERGLEICHENDE ELEKTROPHORESEN VON NORMAL- UND PLASMOZYTOM-SERUM
 (—) (---)

Ordinate : Eiweiß
 Abszisse : FraktionSnr.



Ergebnisse der in vitro Untersuchungen der Enzymhemmung durch Epontol

Unter den im Teil Methodik angegebenen Versuchsbedingungen wurden zwei in Gruppe III beschriebene Elektrophoresen von 22 bzw 26 stündiger Dauer ausgeführt.

Von Lauf I wurden die Fraktionen 17 mit 22, von Lauf II die Fraktionen 16 mit 22, in denen die höchsten Aktivitäten der Serumcholinesterase gefunden worden waren, der Dialyse gegen Phosphatpuffer von $p_H = 7,4$ unterzogen.

In den dialysierten Fraktionen wurden nochmals die Eiweißkörper und die Aktivität der Serumcholinesterase mit Benzoylcholinchlorid als Substrat (Methode Kalow) bestimmt.

Von Epontol wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt; die molaren Konzentrationen des Epontols sind im Teil Methodik angegeben.

An der undialysierten Fraktion 16 des Laufes I wurde der Bereich der enzymhemmenden Epontolkonzentrationen geprüft. Wie aus der Tabelle VI ersichtlich, wurde Epontol in molaren Konzentrationen zwischen 5×10^{-3} und 5×10^{-6} als Inhibitor der Serumcholinesterase bei der Methode Kalow eingesetzt. Die Konzentration 5×10^{-3} M Epontol zeigte bei 240 m μ Totalabsorption und wurde für die dialysierten Fraktionen nicht verwendet.

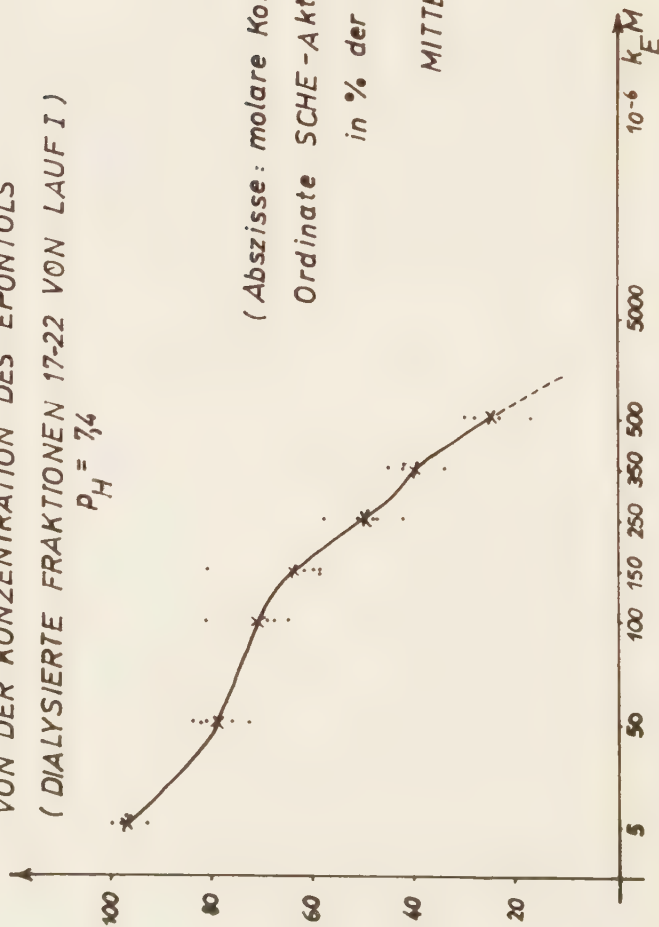
Abbildung 5 zeigt für die Fraktionen 17 - 22 des Laufes I die Hemmung der Serumcholinesterase in Abhängigkeit von der Konzentration des Epontols. In der Abszisse sind die molaren Konzentrationen des Epontols aufgetragen, in der Ordinate die Serumcholinesterase-Aktivität nach Epontol-Zusatz in Prozent der Ausgangsaktivität.

Einer molaren Konzentration des Epontols von 5×10^{-6} entspricht im Mittel eine Serumcholinesterase-Aktivität von 97 %,bezogen auf die Ausgangsaktivität, der von 5×10^{-4} M Epontol nur noch eine Enzymaktivität von 25 %.Hier macht sich die Hemmwirkung des Epontols bereits in einer Aktivitätsminderung von 75 % bemerkbar. Eine Hemmwirkung von 50 % tritt auf bei einer Epontolkonzentration um $2,5 \times 10^{-4}$ M. (Tabelle VII)

Ähnliche Ergebnisse findet man bei den dialysierten Fraktionen 16 - 21 des Laufes II (Abbildung 6, Tabelle VIII). Auch hier zeigt sich bei steigender Verdünnung des Epontols von 5×10^{-4} M auf 5×10^{-6} M eine Abnahme der Hemmwirkung des Epontols auf die Serumcholinesterase von 67 % auf 5 %; die Enzymaktivität verhält sich auch hier umgekehrt proportional zur Konzentration des Epontols.

SERUMCHOLINESTERASE-AKTIVITÄT IN ABHÄNGIGKEIT
VON DER KONZENTRATION DES EPONTOLS
(DIALYSIERTE FRAKTIONEN 17-22 VON LAUF I)

$$p_H = 7,4$$

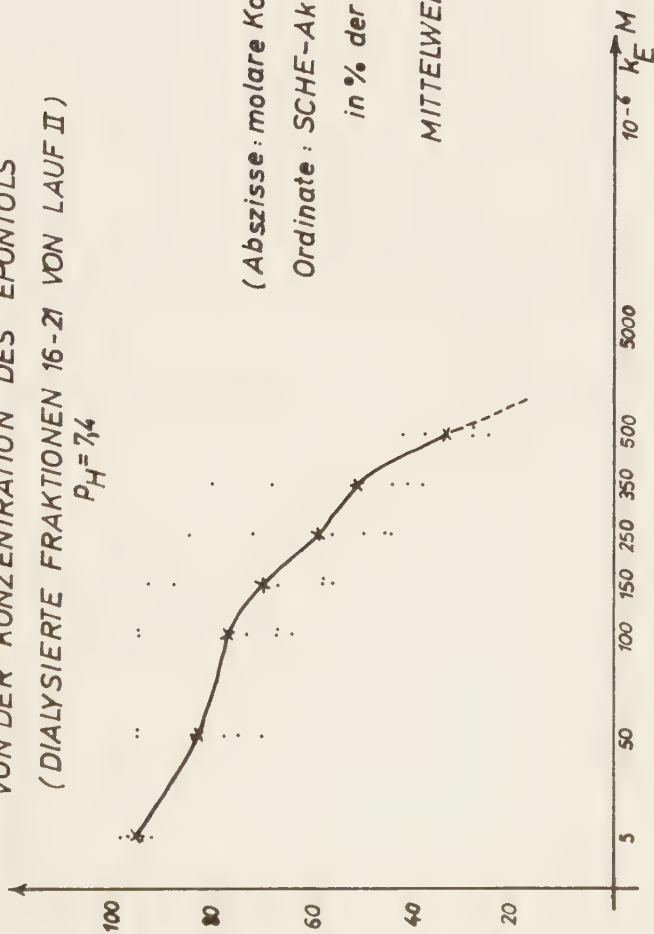


SERUMCHOLINESTERASE-AKTIVITÄT IN ABHÄNGIGKEIT
VON DER KONZENTRATION DES EPONTOLS

(Bestimmung der Serumcholinesterase (Methode Kalow)
der undialysierten Fraktion 16 von Lauf I bei ver-
schiedenen Epontol-Konzentrationen)

Epontol(M)	SCHE ($\Delta E \times 1000$)
-	53
5×10^{-3}	-
5×10^{-4}	0
$3,5 \times 10^{-4}$	15
$2,5 \times 10^{-4}$	20
$1,5 \times 10^{-4}$	35
10^{-4}	40
$7,5 \times 10^{-5}$	40
5×10^{-5}	40
10^{-5}	50
5×10^{-6}	50

SERUMCHOLINESTERASE-AKTIVITÄT IN ABHÄNGIGKEIT
VON DER KONZENTRATION DES EPONTOLS
(DIALYSIERTE FRAKTIONEN 16-21 VON LAUF II)
 $p_H = 7,4$



(Abszisse: molare Konz. des Epontols)

Ordinate: SCHE-Aktivität bei Ep-Zusatz
in % der Ausgangsaktivität)

MITTELWERT —

SERUMCHOLINESTERASE-AKTIVITÄT IN ABHÄNGIGKEIT VON DER KONZENTRATION

DES EPONTOLS

(Bestimmung der Serumcholinesterase nach Kalow in den dialysierten Fraktionen 16 - 22 von Lauf II bei verschiedenen Epontol-Konz.)

F.N.	EW _{280 mμ}	SCHE	SCHE ($\Delta E \times 1000$) bei Epontol-Konz. (M)				
			5×10^{-4}	$3,5 \times 10^{-4}$	$2,5 \times 10^{-4}$	$1,5 \times 10^{-4}$	10^{-4}
II ₁₆	255	155	40	60	70	90	100
II ₁₇	275	260	100	130	145	175	190
II ₁₈	250	210	90	170	180	195	200
II ₁₉	190	220	80	150	160	195	210
II ₂₀	166	240	75	100	120	140	160
II ₂₁	187	90	25	40	40	50	60
Mittelwert in % der Ausgangsaktivität		33	53,5	58,6	70	77	83
							95

D i s k u s s i o n

Die Besonderheiten des trägerfreien, kontinuierlichen Trennverfahrens :

- a) Die Abtrennung der α_1 -Globulinfraktion von den Albuminen gelingt in der trägerfreien Hochspannungselektrophorese weniger gut als in den diskontinuierlichen Trennverfahren, da die Absorptionseffekte fehlen, die z. B. bei der Papierelektrophorese die Abtrennung der α_1 -Globuline von den Albuminen begünstigen.⁴
- b) Da das Serum eine sehr heterogene Zusammensetzung an Eiweißkörpern aufweist, erscheint das Bild der Eiweißverteilungskurve weniger scharf. Die Minima sinken zwischen den Proteingipfeln nicht bis zur Basis ab, da auch in den Zwischenbereichen Proteine vorhanden sind.
- c) Bei langer Versuchsdauer ist eine Verbreiterung der Zonen, in denen die Eiweißkörper wandern, in geringen Grenzen möglich.
- d) Der p_H -Wert der Fraktionen schwankt nur in wenigen anoden- bzw. kathodennahen Fraktionen. Die Fraktionen, in denen Albumine und Globuline enthalten sind, weisen einen sehr konstanten p_H -Wert auf, der dem des Kammertrispuffers von 8,6 entspricht.

Die maximale Aktivität der Serumcholinesterase, in Parallelbestimmungen mit Benzoylcholinchlorid (Methode Kalow) und Acetylcholinbromid (Methode Metcalf-Hestrin) als Substrate ermittelt, konnte einheitlich in allen Elektrophoresen im α_2 - β -Globulinbereich nachgewiesen werden. In den übrigen Bereichen fanden sich keine Enzymaktivitäten, die jenseits des Fehlerbereiches der Meßmethode lagen. Dieser Fehlerbereich beträgt für die Methode Kalow $\pm 2,5$ %.

Für die Methode Metcalf-Hestrin sind die Versuchsfehler bei geringer Enzymaktivität sehr hoch, wie sich aus den variablen Cholinesterasegipfeln bei den Versuchen der Gruppe I ergab. Die Extinktionen differierten in den von einer Fraktion angesetzten drei Proben sehr wesentlich und zeigten in den drei Läufen auch ein ganz verschiedenes Verteilungsmuster. Zu bemerken, daß die höchsten Extinktionen aber auch bei diesem, durch zu geringes Enzymangebot in 0,05 ml Fraktion, mit hoher Fehlerquote belasteten Verfahren, die höchste Enzymaktivität im α_2 - β - Bereich zu finden ist. In eben diesem Bereich erscheint bei Verwendung von 1,5 ml Fraktion übereinstimmend in allen getesteten Läufen ein eingipfliger Bereich von Enzymaktivität.

Das Ergebnis der charakteristischen Beweglichkeit der Serumcholinesterase im α_2 - β - Globulinbereich stimmt mit den Ergebnissen vieler Forschergruppen überein.

Secchi und Dioquardi²⁵ beschrieben die charakteristische Wanderung der Serumcholinesterase mit den α_2 - β - Globulinen.

Svensmark²⁸ wies bei Papierelektrophoresen die charakteristische elektrophoretische Beweglichkeit

der Cholinesterase im menschlichen Serum im α_2 - β - Globulinbereich nach; gleiche elektrophoretische Wanderung fanden De Grouchy und Dubbs und Vivonia⁹ in Stärkegelelektrophoresen.

Togni und Meier²⁹, Cohen und Warringa⁵, Augustinson² wiesen experimentell nach, daß die elektrophoretische Beweglichkeit der Cholinesterase im Serum der Säuger praktisch dieselbe ist; sie liegt im Bereich der α_2 - β - Globuline.

Vincent und Segonzac, Marton und Kalow sagten aus, die Cholinesterase des Serums besitze ihre charakteristische elektrophoretische Beweglichkeit zwischen den α_2 - β - Globulinen.⁴⁶

In den Stärkegelelektrophoresen beobachtete Schwick²⁴ drei schnellwandernde Komponenten, die in anderen elektrophoretischen Techniken nicht nachzuweisen sind, da alle die gleiche α_2 - β - Beweglichkeit besitzen, wie die Hauptkomponente. Diese Tatsache und ihre Abtrennbarkeit auf Sephadex lassen darauf schließen, daß es sich um Fragmente der Cholinesterase handelt.

Nicht bestätigt werden konnten durch die Hochspannungselektrophoresen die Ergebnisse von Pilz, der "schlüssig beweisen konnte, daß menschliches Serum ein Ferment enthält, das spezifisch Acetylcholin, jedoch kein anderes Substrat spaltet".²² Das angewandte Trennverfahren war die präparative Stärkebreielektrophorese.

Bei der gleichen Elektrophoresetechnik kam Pilz²¹ in einer weiteren Arbeit zu folgenden Resultaten: "Es lassen sich zwei reine Acetylcholinesterasen im menschlichen Serum unterscheiden, die nur Spuren von Restaktivität für andere Substrate enthalten. Weiterhin lassen sich elf verschiedene

α -Naphtylpropionat spaltende Enzyme von einander trennen. Alle diese Enzyme spalten auch Benzoylcholin und Butyrylcholin".

Gürtner⁴³ beschrieb, nach Auftrennung des Serums mit der Hochspannungselektrophorese, das Vorkommen mehrerer Acetylcholinesterasen vom Präalbumin bis zum δ -Globulinbereich. Die Benzoylcholin spaltenden Esterasen seien hauptsächlich im Bereich der α_2 -Globuline zu finden, daneben aber auch - allerdings in verschwindend kleinem Prozentsatz - im Albumin, α_1 , β und γ -Globulinbereich. Dies konnte nicht bestätigt werden, da sich alle außerhalb des α_2 - β -Globulinbereichs auftretenden Serumcholinesteraseaktivitäten noch im Fehlerbereich der Meßmethode befanden.

An Serumfraktionen des α_2 - β -Globulinbereichs wurde die Wirkung von Epontol auf die Serumcholinesterase untersucht. Ein wesentlicher Vorteil der Verwendung von Elektrophoresefraktionen lag vor allem darin, daß die Albumin-, β_2 - und δ -Globulinfraktionen eliminiert waren.

Bei dem Nachweis der Serumcholinesterase (Methode Kalow) in den dialysierten Fraktionen 17- 22 von Lauf I und 16 - 21 von Lauf II zeigte sich, daß Epontol in Anfangskonzentrationen zwischen 5×10^{-6} M und 5×10^{-3} M die Spaltung des Benzoylcholinchlorids durch die Serumcholinesterase hemmt. Bei steigender Epontolkonzentration nimmt die Serumcholinesteraseaktivität, gemessen an der Ausgangsaktivität, ab. Bei einer Anfangskonzentration des Epontols von $2,5 \times 10^{-4}$ M - bei der Methode Kalow wird es durch 2 ml Serumfraktion und 1 ml Benzoylcholinchloridlösung noch weiter 1 : 3 verdünnt - tritt etwa 50 % Enzymhemmung auf.

Aus diesen Versuchsergebnissen kann nur indirekt geschlossen werden, daß die Serumcholinesterase einen Anteil an der hydrolytischen Spaltung des Tropanidids besitzt; beweisend sind die Versuche dafür, daß Benzoylcholinchlorid bei Zugabe von Epontol in geringerem Maß hydrolysiert wird. Als Erklärung hierfür bietet sich die kompetitive Hemmung an.

Wirth und Hoffmeister³⁰ (1965) schrieben den raschen Abbau von Epontol im Organismus einer esteratischen Spaltung zu. In Versuchen beobachteten sie, daß durch Paraoxon, einen hochwirksamen Cholinesterase-Blocker, die Epontolnarkose von Ratten nicht signifikant verlängert wurde; auch in vitro trat im Rattenblut durch Paraoxon keine Hemmung der Esterasespaltung ein. Hieraus folgerten sie, daß die Cholinesterase an der Spaltung von Epontol kaum oder nur wenig beteiligt sei.

Sie zogen jedoch nicht in Betracht, daß Ratten keine oder nur sehr geringe Serumcholinesteraseaktivität besitzen. (Goedde, Doenicke, Altland 1967)¹²

Doenicke et al.⁸ (1967) berichten aus in vitro Untersuchungen, die Serumcholinesterase werde zu 50 % durch 5×10^{-4} M Epontol gehemmt in menschlichem Serum mit normaler Enzymaktivität und bei gereinigter, angereicherter Serumcholinesterase. Bei deutlich erniedrigter Serumcholinesteraseaktivität und verringertem Eiweißgehalt ändere sich der I_{50} ebenfalls.

In reiner Albuminlösung und cholinesterasefreiem Serum (Albuminfraktion, γ -Globulinfraktion)⁸ wird Epontol nicht gespalten. (Doenicke et al.)

Zusammenfassung

Durch trägerfreie, kontinuierliche Hochspannungselektrophorese (VAP-ELPHOR) wurden die Eiweißkörper menschlichen Serums in Albumin- und Globulinfraktionen aufgetrennt.

In den Serumfraktionen wurde, nach der colorimetrischen Bestimmung des Eiweißes, die Aktivität der Serumcholinesterase mit Benzoylcholinchlorid als Substrat (Methode Kalow) und mit dem Substrat Acetylcholinbromid (Methode Metcalf-Hestrin) ermittelt.

Bei 21 Elektrophoresen ergab sich eine charakteristische elektrophoretische Beweglichkeit der Serumcholinesterase im α_2 - β -Globulinbereich. In den übrigen Globulin- und Albuminfraktionen ließ sich keine Aktivität der Serumcholinesterase nachweisen.

An dialysierten Serumfraktionen des α_2 - β -Globulinbereichs wurde die Aktivität der Serumcholinesterase mit dem Substrat Benzoylcholinchlorid nach der Methode Kalow ermittelt und Epontol in verschiedener molarer Konzentration als Enzyminhibitor eingesetzt.

Epontol hemmt in steigender Konzentration die Serumcholinesterase. Bei einer Anfangskonzentration von $2,5 \cdot 10^{-4}$ M Epontol tritt etwa 50 %ige Enzymhemmung auf.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1) Alles, G.A. u. R.C. Hawes (1940) :
Cholinesterases in the blood of man
Journ. biol. Chem. 133, 375
- 2) Augustinsson, K-B. (1958) :
Electrophoretic separation and classification
of blood plasma esterases
Nature 181, 1786
- 3) Augustinsson, K-B. (1959) :
Electrophoresis studies on blood plasma esterases
Acta chem. scand. 13, 1097
- 4) Augustinsson, K-B. u. D. Nachmansohn (1949) :
Distinction between acetylcholine-esterase
and other choline-ester splitting enzymes
Science N.Y. 110, 98
- 5) Cohen, J.A. u. M.O.J. Warringa (1957) :
The labelling of human serum gy DF³²P
Biochem. biophys. Acta 25, 600
- 6) Commission on Enzymes
- 7) Dale, H.H. (1914) :
The action of certain esters and esters of
choline and their relation to muscarine
J. Pharm. Ex. Ther. 6, 147
- 8) Doenicke, A., I. Krumei, J. Kugler u. J. Klempa (1967) :
Experimental studies of the breakdown of
Epontol - Determination of Propanidid in
Human serum

- 9) Dubbs,C.A. ,C.Vivonia, J.O. Hilburn (1960) :
Subfractions of human serum-enzymes
Science 131, 1529
- 10) Engelhard,N. ,K.Prchal u. M.Nenner (1967) :
Acetylcholin-Esterase
Angew. Chem. 79.Jahrg.,Nr 13,604
- 11) Glick,D.
Studies on the specificity of choline-
esterase in the human serum
J. biol. Chem. 125, 729 (1938)
" 130, 527 (1939)
" 137, 357 (1941)
- 12) Goedde,H.W., A.Doenicke u. K.Altland (1967) :
Pseudocholinesterasen
Springer Berlin Heidelb. N.Y.
- 13) Gürtner,Th (1967) :
Über Differenzierung und Herkunft der
Serumcholinesterase des Menschen
Fortschritte d. Med. ,85.Jg,Nr11, 471
- 14) Hannig,K. (1964) :
Eine Neuentwicklung der trägerfreien
Ablenkungselektrophorese u. ihre An-
wendung auf zytol. Probleme
Habilitationssarbeit
- 15)Hardegg,W. (1966)
Cholinesterasen
Hoppe-Seyler-Thierf., Bd. 6

- 16) Kalow, W. and Lindsay, H.A. (1955) :
A comparison of optical and manometric
methods for the assay of human serum cholin-
esterase
Canad. J. Biochem. Physiol. 33, 568

- 17) Mendel, B. and D.B. Mundell (1954) :
Studies on cholinesterase; a method for the
purification of pseudocholinesterase
Biochem. J. 37, 473-59

- 18) Mendel, B., D.B. Mundell u. H. Rudney (1943)
Cholinesterase III. Specific tests for true
cholinesterase and pseudocholinesterase
Biochem. J. 37, 473

- 19) Metcalf, R.L., R.B. March and M.G. Maxon (1955) :
Choline-esterases
Ann. entomol. Soc. Amer. 48, 222

- 20) Nachmansohn, D. u. M.A. Rothenberg, Mortimer, A. (1945) :
Studies on cholinesterase; specificity of the
enzyme in nerve tissue
J. biol. Chem. 158, 653

- 21) Pilz, W.
Cholinesterspaltende Fermente des menschl.
Serums

- 22) Pilz, W. u. H. Hörlein (1946)
Untersuchungen über die Acetylcholinesterase
im menschlichen Vollblut u. Routinemethoden
zu deren Bestimmung
Hoppe-Seylers Z. phys. Chem. 219, 1-17

- 23) Richter, D. u. P.G.Croft (1942) :
Blood esterases
Biochem. J. 36, 746
- 24) Schwick, H.G., H.Haupt, K.Heide u. O.Zwisler (1966) :
Isolierung u. physiologisch-chemische Charakterisierung der Cholinesterasen aus Human-serum
Zeitschr. f. Blutforschung, BdXIV, 65
- 25) Secchi u. Dioquardi (1965) :
Multiple forms of serum and liver esterases in the normal state and in the cirrhosis of the liver
Enzym. biol. 29
- 26) Simonart, A. (1933) :
Contribution des derives de la choline
Rev. belge Sci. med. 5, 73
- 27) Stedman, E. u. L.H.Easson (1932) :
Choline-esterase, an enzyme present in the blood serum of horse
Biochem. J. 26, 2056
- 28) Svensmark, O. (1961) :
Human serumcholinesterase as a sialo-protein
Acta phys. scand. 52, 267
- 29) Togni, G.P. u. O.Meier (1953) :
Über das Verhalten der Serumcholinesterase des Pferdes bei der Papierelektrophorese
Experimentia (Basel) 9, 106

30) Wirth, W. u. F. Hoffmeister (1965) :

Pharmakologische Untersuchungen mit Propanidid.

Anaesthesiology and Resuscitation 4, 17

Springer. Berlin, Heidelberg, New York

L e b e n s l a u f

Am 6.4.1943 wurde ich als zweite Tochter des Justizinspektors Friedrich Schuster und seiner Ehefrau Rosa in Heidenheim geboren. Ich wuchs in dem mittelfränkischen Ort auf, besuchte dort von 1949 an vier Klassen der Volksschule und trat 1953 in die Realschule der nahen Kreisstadt Gunzenhausen ein. Da mein Vater im Jahre 1956 als Amtmann zum Amtsgericht Kelheim versetzt wurde, besuchte ich ab Oktober 1956 dort die Donau-Oberrealschule bis zum Abschluß der Reifeprüfung im Juli des Jahres 1962.

Das Studium der Medizin nahm ich im Wintersemester 1962/63 in Erlangen auf, legte nach dem zweiten Semester das Vorphysikum, nach dem fünften die ärztliche Vorprüfung (April 1965) ab. Auf Grund meiner Physikumsleistung wurde ich von zwei Erlanger Professoren für die Studienstiftung des deutschen Volkes vorgeschlagen und im Frühjahr 1966 als Stipendiatin aufgenommen. Im Wintersemester 1965/66 setzte ich mein klinisches Studium an der Universität München fort und legte im Sommer 1968 das Staatsexamen mit sehr gutem Erfolg ab. Das Thema meiner Dissertation erhielt ich im Januar 1966 von Herrn P.D. Dr. A.Doenicke.

